

Estudios a nivel molecular de la conducción y modulación del canal de K^+ KcsA

Esther Marhuenda Segarra

Tutor: José Antonio Poveda Larrosa

Co-tutora: Ana Marcela Giudici Besseghini

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento Agroquímica y Medio Ambiente

Área de conocimiento: Química Física

Grado en Biotecnología

Curso 2015-2016

ÍNDICE

1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	3
3. Palabras clave.....	3
4. Abreviaturas y acrónimos	3
5. Introducción	4
5.1 Canales iónicos.....	4
5.2 Canales de K ⁺	6
5.3 Canal de K ⁺ KcsA	9
5.3.1 Características generales.....	9
5.3.2 Características estructurales	9
5.3.3 Características funcionales	12
5.3.4 Interacción de KcsA con iones	12
5.3.5 Interacción de KcsA con lípidos.....	14
5.3.6 Mutación KcsA R64D	15
6. Antecedentes y objetivos	15
7. Materiales y métodos	16
7.1 Purificación KcsA	16
7.1.1 Producción de proteínas recombinantes mediante expresión heteróloga en <i>Escherichia coli</i>	16
7.1.2 Cromatografía de afinidad	17
7.1.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	17
7.1.4 Diálisis.....	18
7.1.5 Espectroscopia UV-visible	18

7.2	Reconstitución en liposomas	18
7.3	Dicroísmo circular	19
7.4	Espectroscopia de fluorescencia de estado estacionario.....	19
7.5	Fluorescencia y estabilidad térmica.....	19
7.6	Electrofisiología	21
8.	Resultados	21
8.1	Expresión y purificación.....	21
8.2	Caracterización estructural de KcsA R64D.....	22
8.2.1	Caracterización de la estructura de KcsA R64D en disolución	22
8.2.2	Caracterización de la estructura secundaria.....	22
8.2.3	Caracterización de la estructura terciaria.....	23
8.2.4	Estabilidad térmica e interacción con iones permeantes y bloqueadores	24
8.2.5	Caracterización de unión de lípidos a KcsA R64D en micelas de DDM	26
8.3	Caracterización funcional de KcsA R64D reconstituidas en liposomas de asolectina: efecto de la adición de lípidos con carga negativa	27
9.	Discusión.....	29
10.	Conclusiones y proyección futura	32
11.	Bibliografía.....	33

1. RESUMEN

KcsA es un canal de potasio procariota que se utiliza como modelo de canales de potasio gracias a su expresión en cantidades suficientes y a la disposición de su estructura a resolución atómica.

El canal KcsA requiere la presencia de lípidos aniónicos para su correcto funcionamiento y plegamiento. Éstos se unen a una zona de la proteína denominada sitio no anular, en una región hidrofóbica situada próxima a los residuos 64 y 89.

En el presente proyecto se investigará el efecto que tiene tanto en la estructura como en la función y en la unión de lípidos de la mutación R64D, consistente en el cambio de una arginina en la posición 64 por un aspártico.

2. ABSTRACT

KcsA is a potassium channel used as a potassium channel model due to its expression in sufficient quantities, and to the availability of its structure at atomic resolution.

The KcsA channel requires the presence of anionic lipids for its proper function and folding. These lipids bind to a certain part of the protein called non-annular site, which is in a hydrophobic region near the residues 64 and 89.

In this project, it will be studied the effect of R64D mutation both in the function and the structure. This mutation consists in a change of an arginine residue in position 64 for an aspartate.

3. PALABRAS CLAVE

Canales de K⁺, lípidos, electrofisiología, fluorescencia.

4. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CD: dicroísmo circular

DDM: dodecil- β -D-maltósido

EDTA: ácido N,N,N,N'-etilendiaminotetraacético

HEPES: ácido N-2-hidroxipiperazina-N-2'-etanosulfónico

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

KcsA: canal de potasio de *Streptomyces lividans*

K_d: constante de disociación

Kir: canal de potasio rectificador de entrada

Kv: canal de potasio activado por voltaje

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

M: molar

mM: milimolar

PA: ácido fosfatídico

PC: fosfatidil colina

PG: fosfatidil glicerol

R64D: mutación de KcsA en la que se sustituye la arginina del residuo 64 por un aspártico

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

5. INTRODUCCIÓN

5.1 Canales iónicos

La permeabilidad de las membranas al paso de iones depende directamente de la presencia de proteínas integrales de membrana que lo permitan, en concreto, de dos tipos: de bombas y de canales iónicos. Las primeras, constituyen un transporte activo, que utiliza el ATP o la energía lumínica para obtener energía y realizar el transporte mientras que en el caso de las segundas, se trata de un transporte pasivo, en el que los iones fluyen a favor de gradiente electroquímico.^{1,2}

Los canales iónicos se encuentran en todas las células procariotas y eucariotas incluyendo células vegetales y animales. Además desempeñan un papel fundamental en la contracción muscular y en la señalización eléctrica del sistema nervioso.³

Son un grupo diverso de proteínas que constituyen poros estrechos y muy selectivos que pueden abrirse y cerrarse respondiendo a diferentes estímulos. Este proceso de apertura controlada es conocido como *gating*.⁴ Normalmente, los canales suelen permitir el paso de iones como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Cl^- y la capacidad de controlar el flujo de dichos iones es fundamental para muchas funciones esenciales.⁵ Este paso de iones se realiza a favor de gradiente electroquímico a una gran velocidad ($\sim 10^7$ - 10^8 iones/segundo).¹

El concepto de canal iónico surge en la década de los 50, cuando Alan Hodgking y Andrew Huxley describen las corrientes iónicas del axón gigante de calamar mediante el desarrollo de la técnica de *voltage-clamp*, lo que les valió el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1963.⁶ Más tarde, en 1982, Erwin Neher y Bert Sakmann desarrollaron la técnica de *patch-clamp*, que supuso un gran avance en el conocimiento de los canales iónicos. Este trabajo les hizo merecedores del premio Nobel en Fisiología o Medicina en el año 1991. La técnica de *patch-clamp* consiste en aislar parte de la membrana de una célula o un liposoma del resto con una pipeta de vidrio, de manera que cuando se aplique un cambio de potencial ocurra solo en dicha región. Este cambio de potencial se logra aplicando un voltaje, creando así un campo eléctrico que hace que los grupos cargados de la proteína se orienten en función de éste. Esta orientación puede hacer que disminuya la barrera energética que separa el estado abierto del cerrado, favoreciendo así dicha transición.⁶

El siguiente gran avance en investigaciones sobre canales fue en 1998, cuando el grupo del profesor Roderick McKinnon obtuvo la estructura del canal de K^+ procariota KcsA a alta resolución gracias a su cristalización y posterior estudio mediante difracción de rayos X.⁷

A modo de resumen, todos los canales iónicos comparten las siguientes características:

- Pueden ser altamente selectivos a ciertos iones. La selectividad se consigue gracias a que los canales tienen un diámetro determinado y solo los iones del tamaño y carga adecuados serán capaces de atravesarlo.³
- La velocidad de flujo a través de los canales puede ser de varios órdenes de magnitud mayor que el número de recambio de un transportador.
- El paso limitante en la difusión lo constituye la pérdida de la capa de hidratación que han de sufrir los iones cuando pasan por el filtro de selectividad, que constituye la parte más estrecha del canal. De esta forma, al aumentar la concentración de iones se alcanza la velocidad máxima del transporte. Ésta es cercana al límite de difusión.³
- Son compuertas abiertas o cerradas en respuesta a algún proceso celular.

- Los estados abiertos pueden pasar a inactivos tras una estimulación prolongada de forma que regulan el paso de iones a modo de interruptores que determinan la duración de un flujo iónico.¹

En cuanto a su clasificación, podemos encontrar canales que cambien su conformación en respuesta a¹:

- Voltaje: su apertura se produce debido a cambios de voltaje a través de la membrana.
- Estrés mecánico
- Unión a ligando: en este caso pueden ser de dos tipos:
 - o ionotrópicos: si la unión del ligando al canal es directa
 - o metabotrópicos: si se produce la unión de un neurotransmisor no asociado al canal que genera una cascada de señalización y la apertura del canal en última instancia.

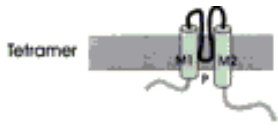
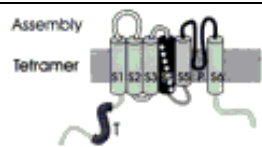

Los canales iónicos activados por voltaje, según el tipo de ión que pasen a su través pueden ser: de Na⁺, de Cl⁻, de Ca²⁺ y de K⁺. En este proyecto nos centraremos en éstos últimos.

5.2 Canales de K⁺

Los canales de K⁺ se localizan en las membranas celulares y controlan el transporte y el flujo de iones de K⁺ hacia el interior y exterior de la célula. Juegan papeles esenciales tanto en células excitables como no excitables y se encuentran en todas las especies excepto en algunos parásitos.⁸

Su estructura cuaternaria consiste en un tetrámero de hélices transmembrana que atraviesan la bicapa lipídica y que forman un poro acuoso central por el que fluye el catión K⁺ a favor de gradiente electroquímico.

Su clasificación se resume en la siguiente tabla:

Clasificación de los canales de K^+	Según su topología ⁹	2 Segmentos transmembrana y un poro (2TM/1P)	Rectificadores internos Kir	
		6 hélices transmembrana y un poro (6TM/1P)	Canales sensibles a voltaje Kv	
		4 segmentos transmembrana y dos poros (4TM/2P)	Responsables de las corrientes <i>background</i> K2P	
	Según su modo de activación	Sensibles a voltaje		
		Sensibles a concentración de calcio		
		Por unión a proteínas G		

Por lo general, los canales cuya apertura depende de voltaje, tienen dominios integrales en la membrana para poder detectar las diferencias de voltaje, mientras que los dependientes de unión a ligando suelen tener grandes dominios citoplasmáticos o extracelulares.^{10,11}

Independientemente de la clase a la que pertenezcan, en los canales de K^+ se pueden distinguir dos grandes dominios: el dominio formador del poro y el dominio regulador. La primera, se encarga de regular el paso de iones, mientras que la segunda, es sensible a estímulos y su estructura varía según la clase de canal.¹²

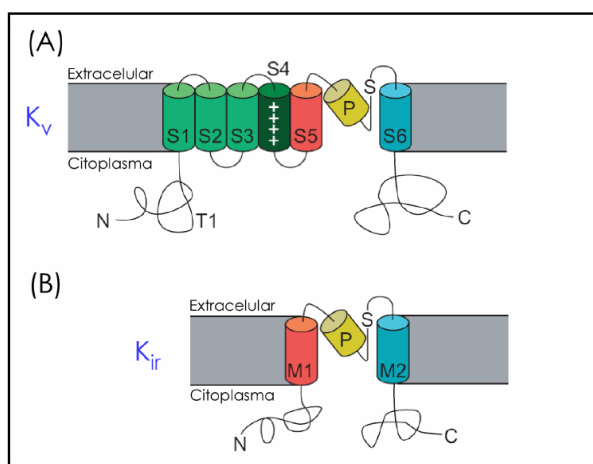


Figura 1. Topología de membrana y características generales de los subtipos de canales de K^+ Kv y Kir. Topología de los canales de K^+ Kv, formados por seis hélices transmembrana (S1-S6), la hélice del poro (P), la secuencia firma (S), los dominios N y C terminales y el dominio de tetramerización T1 (A). Topología de canal Kir igual a la de Kv con la diferencia de que tiene solo dos hélices transmembrana por monómero (M1 y M2) (B).⁴²

En el caso de los canales Kv encontramos una secuencia rica en los aminoácidos arginina y lisina, en lo que constituye la hélice transmembrana S4, la cual es responsable de la sensibilidad a los cambios de voltaje (sensor de voltaje). Además estos canales tienen la particularidad de presentar el dominio

T1, que está altamente conservado y ubicado en la zona amino terminal. Esta estructura estaría relacionada con la oligomerización del canal (**Figura 1**).¹²

A pesar de la variedad de tipos de canales de K^+ , todos poseen la secuencia firma, que es una secuencia de aminoácidos que está sumamente conservada. Dicha secuencia, constituye un elemento estructural conocido como filtro de selectividad, que impide el paso de iones de Na^+ permitiendo el paso del K^+ . Concretamente, los canales de K^+ son hasta 1000 veces más permeables al K^+ que al Na^+ .¹¹

Tal y como puede observarse en la **Figura 2**, los canales Kv y Kir presentan la secuencia firma entre las dos últimas hélices transmembrana (S5 y S6 en un caso, M1 y M2 en el otro).

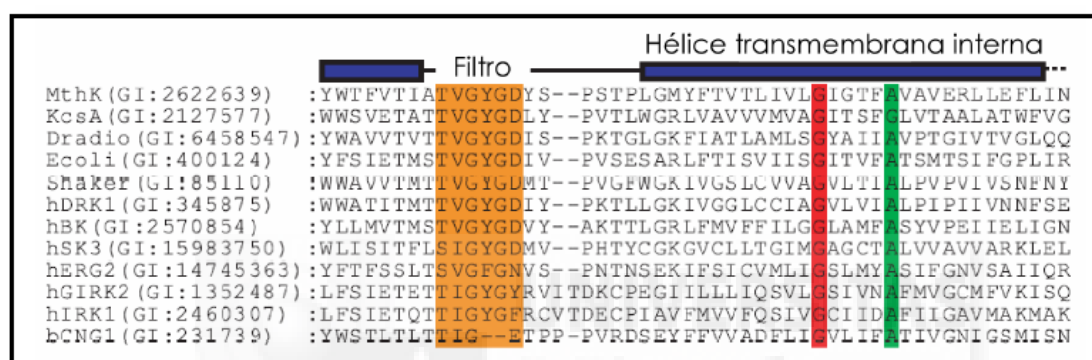


Figura 2. La secuencia que constituye el filtro de selectividad está subrayada en naranja. Se puede observar la gran conservación de esta tanto en canales procariotas como eucariotas.¹¹

La conducción de K^+ está implicada en diversos procesos celulares como son la regulación del volumen celular, la secreción hormonal y la formación del impulso nervioso en células excitables. Su funcionamiento alterado debido a mutaciones está implicado en numerosas enfermedades como arritmias cardíacas, sordera, epilepsia, diabetes y alteraciones en la presión arterial. Estas enfermedades se han bautizado como canalopatías. Se denomina así a toda enfermedad producida por una anomalía en el funcionamiento de los canales iónicos. Estas patologías pueden ocurrir por modificaciones estructurales o funcionales de los canales debidos a cambios genéticamente determinados, o ser la consecuencia del bloqueo en su función por factores externos como toxinas, o sustancias endógenas como anticuerpos (fenómenos autoinmunes).¹³

Tanto los canales de K^+ como los de Na^+ y Ca^{2+} presentan grandes similitudes en las hélices alfa de los segmentos transmembrana que delinean el poro central y en la disposición tridimensional del filtro de selectividad y la zona de *gating*, lo que sugiere que poseen una estructura espacial similar en la zona del poro.⁸

5.3 Canal de K⁺ KcsA

5.3.1 Características generales

El estudio de canales eucariotas reportan numerosos problemas a la hora de tratar con ellos como la búsqueda de un hospedador adecuado para su expresión, que permita la obtención de cantidades suficientes para su caracterización biofísica, etc. Por este motivo, en este proyecto se trabajará con KcsA, un canal de K⁺ procariota de la bacteria *Streptomyces lividans*, que se ha podido obtener en cantidades suficientes a partir de su expresión heteróloga en *Escherichia coli*.¹⁴

KcsA es estructuralmente muy similar a los canales de K⁺ eucariotas, de ahí su idoneidad para el estudio. En la región del poro presenta un 67% de identidad y un 81% de similitud cuando se compara con el canal Kv1 (tipo Shaker)¹⁵. Desde el punto de vista funcional, también presenta muchas similitudes con los eucariotas.¹⁶

El gen *kcsa*, que cuenta con 483 pb, tiene una pauta de lectura abierta con un contenido G+C del 70,6% y codifica una proteína de 17,6 kDa. En su secuencia primaria se reconoce fácilmente la secuencia de la firma típica de los canales de K⁺ y el análisis de hidrofobicidad revela la existencia de hélices alfa transmembrana.¹⁷

KcsA fue el primer canal iónico cuya estructura se resolvió mediante difracción de rayos X, trabajo realizado por MacKinnon y colaboradores,¹¹ lo que también es una ventaja para su uso como proteína modelo.

5.3.2 Características estructurales

El canal de K⁺ KcsA es un homotetrámero, constituido por cuatro subunidades transmembrana con simetría en torno a un poro central. Cada monómero, formado por 160 aminoácidos, tiene dos α -hélices en la región transmembrana, conectadas por una hélice p-loop corta que contiene la secuencia TVGYG y que constituye el filtro de selectividad. En la región intracelular se encuentran los N- y C-terminales.⁷

Al ser un canal que une cationes, tanto el lado extracelular como el intracelular están negativamente cargados por aminoácidos ácidos. Esto tiene como consecuencia que alrededor del canal se acumulen los iones positivos y descendan los negativos, constituyendo un primer paso en el proceso de selectividad. Además, la parte extracelular del canal se estrecha en lo que constituye el filtro de selectividad, por lo que los iones tendrán que perder su esfera de hidratación para atravesarlo.⁷

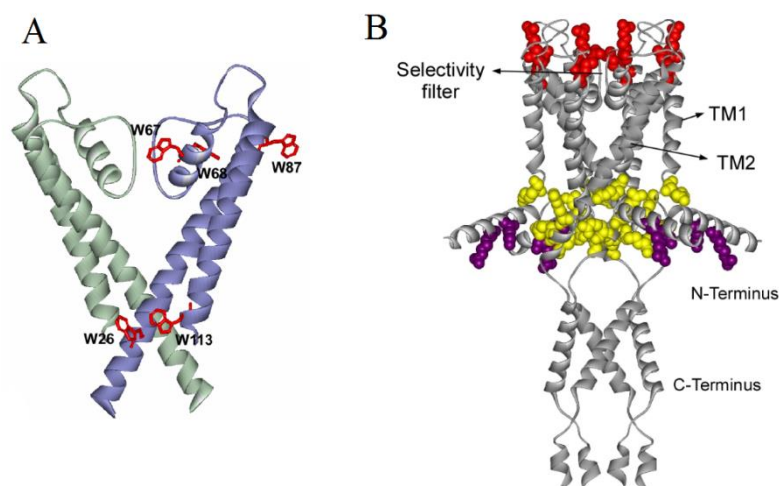


Figura 3. Ubicación de los triptófanos en las caras intra y extracelular de KcsA, que otorgan al canal propiedades fluorescentes (A).⁷ Representación en cintas del canal KcsA. Los residuos R11 y K14 del N-terminal se muestran como esferas violetas; R27, R117, R121 y R122 están situados en la parte citoplasmática próxima al C-terminal, representados en amarillo; las argininas del sitio no anular R64 y R89 se ven en forma de esferas rojas (B). En ambos casos tan solo se representan dos subunidades para mayor claridad.

En el canal de K^+ KcsA se pueden distinguir las siguientes partes:

- Dominio N-terminal: la región N-terminal forma una hélice anfipática que se ancla a la interfase lípido-agua de la membrana, y que orienta de manera que no interacciona con el resto del canal (**Figura 3B**). Debido a su gran movilidad, no se ha podido resolver mediante difracción de rayos X.¹⁸
- Dominio C-terminal: al igual que en el caso del N-terminal, debido a su elevada movilidad no se pudo inicialmente determinar su estructura mediante difracción de rayos X, por lo que se usaron técnicas alternativas para aproximar su estructura como la resonancia de espín electrónico. Se observó que el extremo C-terminal adopta una estructura helicoidal en la que los segmentos de los cuatro monómeros se entrecruzan. Sin embargo, en 2009 el grupo del Dr Eduardo Perozo consiguió resolver la estructura de la proteína incluyendo el C-terminal mediante difracción de rayos X gracias al uso de un anticuerpo contra ese dominio y se reafirmaron los datos obtenidos hasta el momento¹⁹. Además se reveló que el dominio C-terminal se extiende unos 70 Å hacia el interior del citoplasma, formando un manojo de hélices alfa que se estabiliza mediante puentes de hidrógeno y puentes salinos con las cadenas laterales de ciertos aminoácidos de cadenas adyacentes. Se sabe además que la función del C-terminal es participar en la estabilización térmica de la proteína y mejorar la eficacia de la tetramerización durante su plegamiento.²⁰
- Hélices transmembrana: cada subunidad cuenta con dos hélices, dispuestas en la membrana de manera que junto con las de las otras subunidades forman una especie de cono, con su extremo ancho dirigido hacia el exterior de la célula, por donde los iones K^+ abandonan el canal. Una de ellas es externa (M1) que interacciona con los lípidos de membrana y otra interna (M2) que está

orientada hacia el poro (**Figura 3B**). Esta última se puede encontrar entrecruzada con las hélices internas de las otras subunidades originando el estado cerrado (*gate 1*). Disponen de gran flexibilidad para poder dar lugar al estado abierto.²⁰ Las propiedades fluorescentes que posee el canal son debidas gracias a la existencia de cinco triptófanos en la interfase lípido-agua: dos en la parte intracelular, al comienzo del dominio C-terminal (W26 y W113) y tres en la parte extracelular (W67, W68 y W87), que estabilizan el filtro de selectividad. Cualquier cambio en la conformación de la proteína se verá reflejado en un cambio en la fluorescencia emitida por éstos (**Figura 3A**). Se ha comprobado previamente que W67 y W68, cercanos a al filtro de selectividad, son residuos muy sensibles a la conformación de la proteína.

- Cavity central: desde dentro de la célula hacia fuera, el canal comienza como un túnel de 18 Å de longitud para después ensancharse en una cavidad, localizada en el centro de la membrana, que está formada predominantemente por residuos hidrofóbicos. Permite el paso de los iones permeantes con su esfera de hidratación, de manera que su función es estabilizar dichos cationes. Este túnel es lo suficientemente ancho como para que un ión de K^+ lo atravesase y llegue hasta la cavidad sin perder su hidratación.⁷

- Hélices del poro: se encuentran cercanas a la cara extracelular del canal y su extremo carboxi terminal está orientado hacia el interior de la cavidad formando un dipolo que facilita la estabilidad de los cationes en la misma. Está constituido por las hélices p-loop.

- Filtro de selectividad: está orientado de forma que los grupos carbonilo de los aminoácidos que lo forman (TVGYG) se dirigen hacia el poro central, mientras que las cadenas laterales se orientan hacia el interior proteico de manera que interactúa con las hélices que forman el poro.

Los iones K^+ que vayan a atravesar el filtro, se encontrarán con cuatro capas de átomos de oxígenos de grupos carbonilos y una capa de átomos de oxígeno del grupo hidroxilo de residuos de treonina, que originan cuatro sitios de unión, numerados del 1 al 4 de la parte extracelular a la intracelular.¹¹

El filtro de selectividad constituye la parte más estrecha del canal, de forma que los iones habrán de perder su esfera de hidratación para pasar por éste. Esto supone un coste energético elevado, que es compensado gracias a que los oxígenos de los grupos carbonilo de los aminoácidos del filtro entran en contacto con el ion ocupando el lugar de los oxígenos de las moléculas de agua. Los grupos carbonilo del filtro de selectividad se encuentran a las distancias adecuadas para acomodar los iones K^+ u otros iones de tamaño similar. En cambio, otros iones alcalinos como el Na^+ (0,95 Å), el Li^+ (0,60 Å) son demasiado pequeños.^{21,7}

5.3.3 Características funcionales

KcsA presenta una alta selectividad por K^+ frente a Na^+ . El canal se activa gracias a la acción de protones en la zona intracelular de la proteína, que provoca un movimiento conformacional de los segmentos TM2 permitiendo la apertura del canal. Posteriormente, pasa a un estado inactivado del que se recupera lentamente. Por este motivo, su probabilidad de apertura es baja (0,1).^{22,23,24,25,26}

Mediante técnicas fluorescentes, Blunk y col.²⁷ detectaron que KcsA posee dos puertas de gating. Una de ellas corresponde al entrecruzamiento entre la zona C-terminal de las hélices TM2 (residuos 112 a 119), que es sensible a pH ácido^{18,28} y la otra, al filtro de selectividad. La primera sería la responsable del paso del estado abierto al cerrado y la segunda, del cambio entre abierto e inactivado (**Figura 4**).

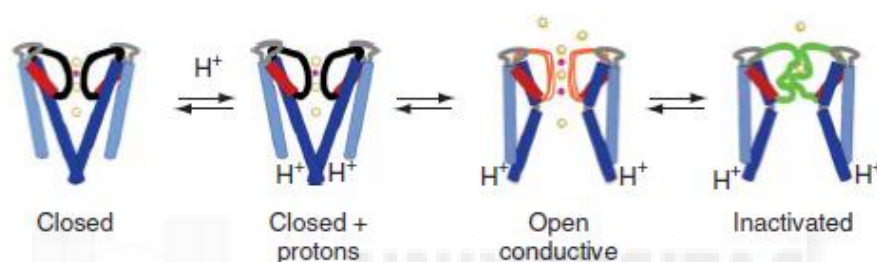


Figura 4. Representación de la conformación estructural asociada a cada estado cinético de KcsA.²⁶

La inactivación tipo C de KcsA es un proceso sensible a la concentración externa de K^+ por el que el canal entra en una conformación no conductora, determinando así el tiempo de apertura del canal. Es la responsable de su pequeña probabilidad de apertura y está regulada por las interacciones entre los aminoácidos Glu71 y Trp67, ubicados en la hélice del poro de la misma subunidad y también por las interacciones entre éstos y el Asp80 (tríada de inactivación). Dichas interacciones desestabilizan el estado conductor del filtro de selectividad.²⁶

Aunque los registros de canal único de KcsA muestran una baja probabilidad de apertura, se sabe que cuando se encuentran en *clusters*, su patrón cambia y se observan mayores tasas de apertura, incluso a pH neutro. Un *cluster* es un conjunto de proteínas acopladas que presentan comportamientos integrados, como por ejemplo *gating* asociado.²⁰

5.3.4 Interacción de KcsA con iones

Gracias a la resolución de la estructura cristalográfica del canal procariota KcsA en diferentes condiciones iónicas, se ha observado que el filtro de selectividad adopta conformaciones distintas según se encuentre en altas o bajas concentraciones de K^+ . Cuando la concentración de K^+ es baja (5 mM), el filtro se encuentra en la conformación no conductora, también llamada colapsada. En

El Na^+ , que es un bloqueador fisiológico de KcsA, solo tiene un sitio de unión en el canal cuya ocupación está relacionada con la formación de un estado no conductor²⁹:



5.3.5 Interacción de KcsA con lípidos

La estructura y la función de muchas proteínas de membrana están moduladas por la interacción con lípidos. Estos lípidos pueden estar unidos al sitio anular o al sitio no anular. Los primeros se unen a la proteína con baja afinidad, mientras que los segundos se unen con alta afinidad a zonas hidrofóbicas de las proteínas de membrana y en ocasiones copurifican con ésta; además favorecen su actividad óptima y su correcto plegamiento.^{31,32}

La estructura obtenida a partir de difracción de rayos X, mostró que el canal KcsA estaba unido de forma no covalente a lípidos en su sitio no anular.^{33,34} Este lípido resultó ser fosfatidil glicerol (PG)³⁵, con la cadena acílica sn-1 unida a una hendidura en la superficie de la proteína, entre TM1 y TM2 de dos monómeros de KcsA adyacentes (**Figura 7**), mientras que la cadena sn-2 se une de forma más periférica. El PG (carga negativa) se localiza en la interfase lípido-agua, cerca del triptófano 67 y de las cadenas laterales de la arginina 64 y 89 (carga positiva), sugiriendo que se mantiene unido gracias a fuerzas electrostáticas.^{31,34}

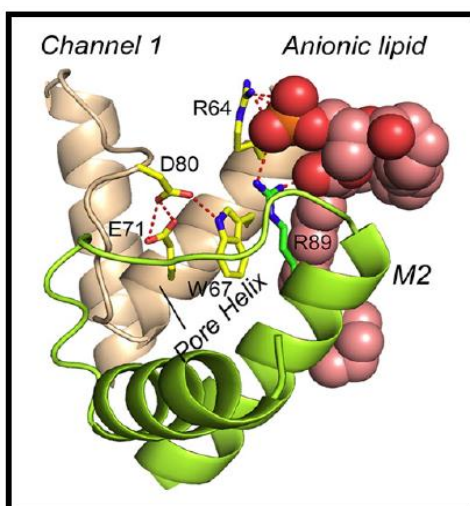


Figura 7. Modelo molecular de la interacción entre fosfolípidos aniónicos y el sitio no anular de KcsA. Se muestra la porción extracelular de la estructura cristalográfica de KcsA. Las esferas representan una molécula de lípido aniónico, el sitio no-anular adyacente al lípido está representado en verde y marrón. Se ha señalado en código de una letra los aminoácidos involucrados. Los enlaces de hidrógeno se señalan como líneas discontinuas rojas. Se puede apreciar la tríada de inactivación W67-E71-D80 y la interacción entre el lípido y los residuos R64 y R89.³⁷

KcsA tiene un requerimiento absoluto por la unión de lípidos aniónicos para su funcionamiento³⁶ y para la correcta actividad del canal sería suficiente que estén ocupados por lípidos tres de los cuatro sitios no anulares.³²

Además del PG, hay otros lípidos aniónicos que se pueden unir a los sitios no anulares como el ácido fosfatídico (PA). A diferencia del PG, éste tiene la capacidad de aumentar su carga negativa cuando está en presencia de residuos cargados positivamente. Este es el motivo por el que se une más fuertemente al canal, reforzando la hipótesis de su unión por fuerzas electrostáticas.³¹ De acuerdo con esta hipótesis³⁷, se ha comprobado que la sustitución de un aminoácido cargado positivamente del sitio no anular por otro cargado negativamente, desfavorece la unión del lípido aniónico debido a repulsiones electrostáticas. Por otro lado, existen otros tipos de lípidos que no tienen carga negativa, los zwitteriónicos, como por ejemplo la fosfatidilcolina (PC), que no se unen con tanta afinidad al sitio no anular como los aniónicos.³⁸

A parte de la unión al sitio no anular, también se han encontrado lípidos unidos con especificidad a grupos determinados de aminoácidos en otras zonas de la proteína, los denominados *hot-spots*. Son residuos conservados generalmente polares y que establecen interacciones mediante fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno.^{37,39}

5.3.6 Mutación KcsA R64D

La mutación objeto de estudio se realizó en un residuo fundamental para la unión de lípidos aniónicos, pues está muy próximo al sitio no anular. Consiste en el cambio del residuo arginina 64 por un aspártico.

Como ya se ha comentado, la unión de lípidos aniónicos al sitio no anular se basa en interacciones electrostáticas, por lo que el cambio de un aminoácido positivo como es la arginina por otro negativo como es el glutámico, desfavorecería la unión de lípido al canal debido a fuerzas de repulsión.

Sin embargo, esta mutación presenta otro efecto que es el de la estabilización debido a la formación de un puente salino entre el aspártico de la posición 64 y la arginina 89. Este puente salino contribuye también impidiendo la unión de los lípidos al sitio no anular.³²

6. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El canal KcsA fue el primer canal iónico en ser cristalizado, en 1998. Desde entonces se ha caracterizado tanto su estructura a nivel atómico como su función.⁷

Numerosos grupos de investigación han estudiado el efecto de los lípidos como moduladores la estructura y la función de KcsA. De hecho, la unión de lípidos aniónicos aumenta la actividad del

canal silvestre y su estabilidad. Esto tendría relación con su unión al sitio no anular y la desestabilización de la tríada de inactivación, en los que el residuo R64 podría tener un papel crucial.

Por todo lo anterior, este trabajo plantea los siguientes objetivos:

Objetivos:

1. Caracterizar estructuralmente el mutante R64D del canal de K^+ KcsA solubilizado en micelas de detergente.
2. Estudiar el efecto de los lípidos aniónicos en la estabilidad térmica de la proteína mediante un sistema de micelas mixtas.
3. Caracterizar funcionalmente el mutante R64D del canal de K^+ KcsA reconstituido en vesículas lipídicas con diferentes porcentajes de lípido negativo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Purificación KcsA

7.1.1 Producción de proteínas recombinantes mediante expresión heteróloga en *Escherichia coli*

Para obtener la proteína KcsA, se utilizaron células de *Escherichia coli* BL21, a las que se les indujo el estado de competencia previamente mediante incubación con cloruro calcio. Las células se transformaron mediante shock térmico con el plásmido pT7 que codifica la proteína KcsA con la mutación R64D y seis histidinas en el extremo N-terminal de la proteína para su posterior purificación. El plásmido lleva también un gen de resistencia a ampicilina para favorecer su selección. Se sembraron las bacterias en un medio sólido (LB-agar) que contiene 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y se dejan crecer toda la noche en una estufa a 37°C. Aquellas bacterias no transformadas, murieron debido a la presencia del antibiótico.

Después, se seleccionó una colonia y se preparó un preinóculo introduciéndolo en un medio líquido (500 mL de LB) suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) y glucosa (0,04%) y se dejó agitando durante toda la noche a 200 rpm y a 37°C. Se transfirió este volumen a otro medio que es el inóculo y consiste en 5 L de medio 2xYT y se dejó crecer por aproximadamente dos horas a 30°C y agitación constante, hasta alcanzar la fase de crecimiento semilogarítmica, o lo que es lo mismo, hasta obtener una densidad óptica del 0,4 ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Una vez alcanzada, se añadió isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) (0,1 mM) y se dejó por dos horas a 30°C en agitación para que las bacterias expresaran la proteína.

Se centrifugó a 4°C y 6.500 g durante 15 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante se descartó y el pellet se congeló. Al día siguiente, se suspendió en 50 mL tampón/1L de cultivo. Dicho tampón contenía 20 mM HEPES, 0.45 M sacarosa, cocktail de inhibidores de proteasas y 40 mg/100 mL tampón de lisozima, pH 7,5. Se sonicó la muestra y se procedió a otra centrifugación en la ultracentrífuga a 100.000 g durante 45 minutos. Se descartó de nuevo el sobrenadante y conservamos el pellet, donde está la fracción de membranas con las proteínas que esta contenga. Se añadió 25 mL tampón/1L de cultivo y se resuspendió en el politrón. El tampón contiene HEPES 20 mM, KCl 200 mM, n-dodecil- β -D-maltósido (DDM) 10 mM, Imidazol 50 mM, pH 7,5. Después se dejó solubilizando con agitación suave durante al menos dos horas para conseguir extraer la proteína de las membranas. Se centrifugó a 4°C y 100.000 g durante 45 minutos y conservamos el sobrenadante, que es donde está la proteína solubilizada en las micelas de detergente (DDM).

7.1.2 Cromatografía de afinidad

Para hacer posible la obtención de KcsA mediante cromatografía de afinidad, es necesario que el canal tenga adheridos a su extremo N-terminal una cola de seis histidinas, que permiten su unión específica a una matriz o fase estacionaria que contiene grupos quelantes de Ni^{2+} , el cual forma un complejo de coordinación entre los componentes de la fase estacionaria y el grupo imidazol de los residuos de la cola de histidina. La unión de KcsA a la resina se llevó a cabo al menos durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, la mezcla se cargó en una columna cromatográfica y se lavó con suficiente tampón (HEPES 20 mM, KCl 200 mM, DDM 5 mM, imidazol 50 mM, pH 7,5) hasta eliminar las proteínas que interaccionan débilmente o no interaccionan. Para asegurarnos de que no quedaban proteínas unidas inespecíficamente en la columna, cuando pasaron aproximadamente 250 mL de tampón, se midió la absorbancia a 280 nm y si la absorbancia es menor a 0,1 se considera que el lavado ha concluido. Para la elución se usaron 15 mL de un tampón que contiene HEPES 20 mM, KCl 200 mM, DDM 10 mM, imidazol 500 mM, pH 7,5. Esta alta concentración de imidazol tiene como consecuencia el desplazamiento de la proteína por unión al níquel. La detección de la proteína en las fracciones eluidas se llevó a cabo con una electroforesis en gel de poliacrilamida (13,5%) con SDS y posterior tinción con azul de Coomassie (1). Una vez obtenidos los resultados, separamos el volumen total de proteína en dos grupos: por un lado tendremos la fracción más concentrada y por otro lado la menos concentrada.

7.1.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

Se hizo un gel de poliacrilamida (13,5%) con SDS (en condiciones desnaturalizantes) según Laemmli para observar el estado de la proteína obtenida.⁴⁰

7.1.4 Diálisis

Con el fin de eliminar el imidazol para evitar interferencias espectroscópicas, se realizó una diálisis. Además, de dializar frente a K^+ , ion en el que se obtuvo la proteína, también se dializó frente otros iones como Na^+ y NMG^+ para ver su efecto en la estructura. La composición de los tampones que se usaron para las distintas diálisis fueron:

- 20 mM HEPES, 5 mM DDM, 100 mM K^+ pH 7
- 20 mM HEPES, 5 mM DDM, 100 mM NMG^+ pH 7
- 20 mM HEPES, 5 mM DDM, 100 mM Na^+ pH 7

7.1.5 Espectroscopia UV-visible

La cuantificación de proteínas se realizó mediante espectroscopía UV-Visible, midiendo la absorbancia a 280 nm. La concentración es hallada utilizando la ley de Lambert-Beer.

$$Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$$

ϵ designa el coeficiente de extinción molar, que en este caso es $34.950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, donde c es la concentración (M) proteica, y l es el paso óptico, cuya unidad es cm.

7.2 Reconstitución en liposomas

Para poder hacer medidas funcionales, KcsA fue incorporado en vesículas lipídicas. Así, primero se prepararon vesículas unilamelares de asolectina con un contenido de PA de huevo del 25% y 50% a 20 mg/mL, en HEPES 10 mM pH 7,5 adicionado con KCl 100 mM y se almacenaron en N_2 líquido.

Para su uso, tras descongelarse, se diluyeron a una concentración final de 5 mg/mL con un tampón que contiene HEPES 10 mM, KCl 100 mM, pH 7. Después de sonicar durante 30 minutos y llevar a un volumen de 12 mL con el tampón usado anteriormente, se añade la proteína purificada solubilizada en DDM (en una proporción lípido:proteína 100:1 en masa) mientras se agita. Los proteoliposomas se formaron mediante eliminación del detergente por la adición de Bio-beads (BioRad). Posteriormente se centrifugó 65 minutos a 300.000 g a 4 °C para sedimentar los proteoliposomas formados y separarlos así de las Bio-beads. Se separaron en alícuotas de 20 μ L y se almacenó a -80°C.

Para formar liposomas gigantes multilaminares, se colocan 5 μL de proteoliposomas en un portaobjetos de vidrio y se deja secar durante toda la noche en un desecador a 4°C. Al día siguiente la muestra se rehidrata con 10 ó 20 μL de HEPES (pH 7).

7.3 Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano se midieron en un espectropolarímetro Jasco J810 a una velocidad de 100 nm/min con una resolución de 0,5 nm, en un rango de longitudes de onda entre 200 y 260 nm. La elipticidad media por residuo θ_{MRW} se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$[\theta] = \frac{\theta_{MRW}}{10 \cdot lc \cdot (N - 1)}$$

donde θ se mide en grados, MW es la masa molecular del monómero de KcsA (Da), l es el paso óptico (cm), c es la concentración de KcsA (g/mL) y N es el número de residuos.

La concentración final de proteína utilizada en este ensayo fue 6 μM .

Para hallar la aportación de cada tipo de estructura a la estructura secundaria de la proteína, se realizó la deconvolución de los espectros con el programa CDNN.

7.4 Espectroscopia de fluorescencia de estado estacionario

Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína fueron medidos en el espectrofluorímetro SLM 8000, usando cubetas de cuarzo con un paso óptico de 0,5 cm. Las muestras se excitaron a 280 nm y la emisión fue registrada entre 300 y 400 nm con incrementos de 1 nm. Las muestras se midieron con una concentración de KcsA de 1 μM en un buffer que contenía DDM 5 μM , HEPES 200 mM y de sal (K^+ o Na^+) 100 mM. Además se añadió K^+ 1 M o Na^+ 1 M para alcanzar una concentración final de sal de 100 mM.

7.5 Fluorescencia y estabilidad térmica

La desnaturalización térmica de la proteína KcsA R64D se llevó a cabo en un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse midiendo la emisión intrínseca a 340 nm dependiente de la temperatura tras

excitar a una longitud de onda de 280 nm. La rampa de temperatura se llevó a cabo a una velocidad de 0,6 °C/min en todos los experimentos.

Para realizar el estudio del efecto de la concentración de K⁺ y de Na⁺ y lípidos con carga negativa sobre la estabilidad térmica de KcsA en condiciones no competitivas, se realizó el experimento en muestras que contenían 1 µM de proteína, en un tampón HEPES 20 mM, DDM 5 mM y concentraciones crecientes de KCl, NaCl o lípidos (Avanti Polar Lipids) en cubetas con un paso óptico de 1 cm. La temperatura media de disociación del tetrámero en monómero se calculó de la curva de desnaturalización térmica ajustando los datos a un modelo de dos estados de desplegamiento. La fórmula a la que se ajusta el modelo de dos estados es³¹:

$$(1) \quad F_{340} = \frac{\alpha_N + \beta_N(T - 298) + (\alpha_D + \beta_D(T - 298))e^{\frac{-\Delta H_{D-N}}{R}(\frac{1}{T} + \frac{1}{T_m})}}{1 + e^{\frac{-\Delta H_{D-N}}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}}$$

donde F_{340} es la emisión de fluorescencia observada a una temperatura dada, α_N y α_D son las fluorescencias intrínsecas del estado nativo y del estado desnaturalizado respectivamente a 289 K, β_N y β_D son las pendientes de las líneas base de los estados nativo y desnaturalizado respectivamente, T es la temperatura, T_m es la temperatura de desnaturalización en kelvin, ΔH_{D-N} es el cambio de entalpía de desnaturalización, que está relacionado con la pendiente de la curva a T_m , R es la constante de los gases. Para hacer los ajustes se usó el programa Kaleida Graph (Synergy Software).

La estabilización del estado nativo de la proteína en relación al desnaturalizado como consecuencia de la unión de un determinado ligando, L , dependerá tanto de la concentración de ligando, $[L]$, como de la constante de disociación (K_D).

$$(2) \quad \Delta G_{despl} = \Delta G_0 + RT \ln \left(1 + \frac{[L]}{K_D} \right)$$

donde ΔG_{despl} y ΔG_0 representan los cambios de energía libre debidos al desplegamiento en presencia y ausencia de ligando, respectivamente. Por tanto, podemos visualizar el efecto estabilizante de los ligandos unidos derivado de la energía libre extra necesaria para eliminar el ligando de su sitio de unión en la conformación nativa de la proteína. La estabilización de la proteína será mayor cuanto mayor sea la afinidad del ligando por ésta.

El aumento de la temperatura media de transición para la desnaturalización inducida por calor en presencia de concentraciones crecientes de ligando puede ser usada para estimar la constante de disociación de la proteína y el ligando mediante el programa Origin Lab según la ecuación:

$$(3) \quad \frac{\Delta T_m}{T_m} = \frac{T_m - (T_m)_0}{T_m} = \frac{R(T_m)_0}{\Delta H_0} \ln \left(1 + \frac{[L]}{K_D} \right)$$

donde T_m y $(T_m)_0$ hacen referencia a la temperatura de desnaturalización (en grados Kelvin) para la proteína en presencia y en ausencia de ligando respectivamente, R es la constante de los gases y ΔH_0 es el cambio de entalpía que tiene lugar durante la desnaturalización de la proteína en ausencia de ligando.

7.6 Electrofisiología

Los registros de *patch clamp* se realizaron en parches formados por liposomas gigantes usando un sistema automático de *patch clamp* (Nanion Technologies, Germany). Se utilizaron chips de borosilicato con resistencias de 8 M Ω . Al comenzar, se aplicó una presión negativa para colocar una vesícula de asolectina en la abertura del chip y como resultado se formó una bicapa lipídica planar en la apertura, dando lugar a un sello. Después de la formación del sello, se llevó a cabo un lavado con el correspondiente tampón intracelular. Las corrientes se registraron usando un amplificador EPC-10 con una ganancia de 10 o 50 mV/pA. Los datos fueron digitalizados a 8 kHz y se analizaron utilizando el programa de ordenador Clampfit. Todas las medidas fueron tomadas a temperatura ambiente, con una solución extracelular compuesta por el tampón HEPES 10 mM (pH 7) y una solución intracelular compuesta por el tampón MES 10 mM (pH 4), ambas soluciones con las condiciones iónicas indicadas (KCl 100 mM).

8. RESULTADOS

8.1 Expresión y purificación

Después de la elución de la cromatografía de afinidad, se obtuvieron 8 alícuotas que contenían en distintas concentraciones la proteína KcsA R64D. El rendimiento de la purificación que fue de 1,6 mg/L de cultivo, fue ligeramente superior con respecto a wt (1 mg/L).

La localización de las alícuotas que contienen proteína purificada se realizó mediante la técnica de SDS-PAGE. En la **figura 8** se observa la presencia de tetrámero, con una movilidad electroforética correspondiente a entre 72 y 52 kDa. La banda está un poco más debajo de lo que deberíamos encontrarla (70,4 kDa) ya que al ser una proteína de membrana, se encuentra en un medio con detergente, lo cual altera sus propiedades migratorias. También se puede apreciar que una pequeña fracción de proteína se encuentra en estado monomérico, a un tamaño aproximado de 17 kDa.

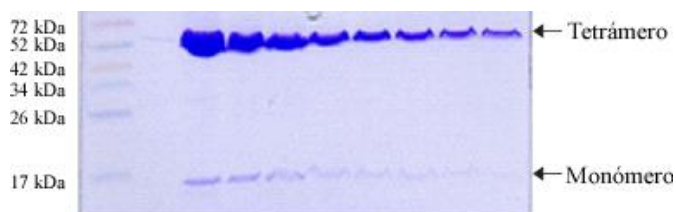


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (13,5%) con SDS de la purificación de KcsA R64D. En la primera calle se observa el marcador de peso molecular (MW).

8.2 Caracterización estructural de KcsA R64D

8.2.1 Caracterización de la estructura de KcsA R64D en disolución

La proteína KcsA se purificó en presencia de K^+ y se dializó frente a K^+ 100 mM (para eliminar el imidazol), Na^+ 100mM y NMG^+ 100 mM. Posteriormente se comprobó que era estable y mantenía su estructura tetramérica en todos estos iones mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (13,5%) con SDS.

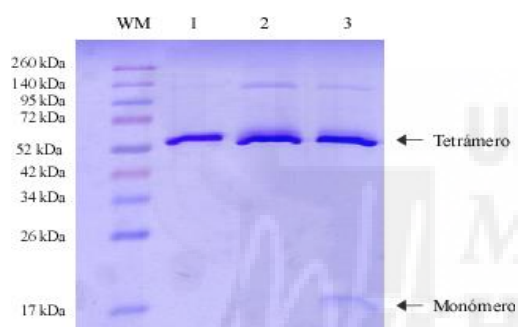


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida (13,5%) con SDS donde se muestra la estabilidad de KcsA R64D en diferentes iones. En la calle WM se encuentra el marcador de peso molecular, en la calle 1 la proteína en NMG^+ , en la calle 2 en Na^+ y en la calle 3 en K^+ .

La N-metil-glucamina (NMG^+) es un catión orgánico que debido a su gran tamaño no es capaz de atravesar el canal de K^+ KcsA. A menudo es utilizada para sustituir el Na^+ extracelular en estudios experimentales y ayuda a mantener la solución en condiciones isotónicas en ausencia de otros iones.

Mediante SDS-PAGE (**Figura 9**) se comprobó que la estructura tetramérica de KcsA R64D se mantenía íntegra en cualquiera de las condiciones iónicas probadas. Una vez verificado esto se procedió a caracterizar la estructura del canal mediante técnicas espectroscópicas.

8.2.2 Caracterización de la estructura secundaria

El dicroísmo circular es una técnica ideal para monitorear cambios conformacionales en la estructura secundaria de las proteínas, especialmente en aquellas con un alto contenido en hélices alfa, a consecuencia de cambios en los parámetros experimentales.⁴¹

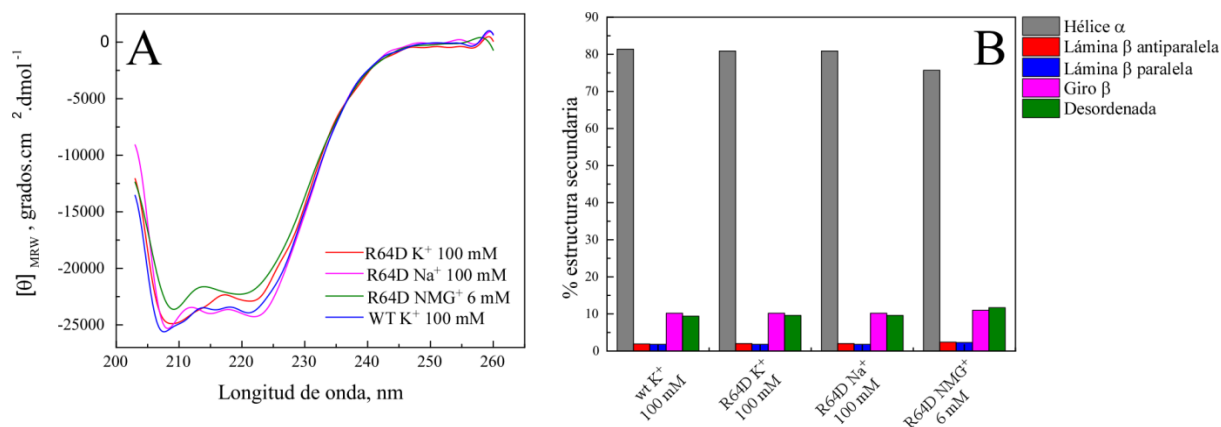


Figura 10. Análisis de la estructura secundaria de mediante CD en el UV lejano. KcsA R64D en diferentes condiciones iónicas: K⁺ 100 mM (rojo), Na⁺ 100 mM (verde), NMG⁺ 6 mM (morado). Se incluye el espectro de KcsA silvestre en K⁺ 100 mM (azul) para su comparación. Las muestras contienen 6 μM de proteína y en un tampón NMG 5 mM, DDM 5 mM y HEPES 20 mM pH 7 (A). Cuantificación del porcentaje de cada tipo de estructura mediante la deconvolución de los espectros de KcsA silvestre en K⁺ 100 mM y KcsA R64D en K⁺ 100 mM, Na⁺ 100 mM y NMG⁺ 6 mM (B).

En este estudio se sometió a KcsA R64D a diferentes condiciones iónicas y KcsA wt (fenotipo silvestre) a la técnica de dicroísmo circular en el UV lejano. Posteriormente se realizó la deconvolución de los espectros utilizando el programa CDNN para hallar la aportación de cada tipo de estructura a la estructura secundaria de la proteína. De este modo se pretende averiguar si la mutación causa algún cambio significativo en esta última.

En los espectros obtenidos, tanto en el caso de R64D en diferentes condiciones iónicas como KcsA wt, (**Figura 10A**) se observan dos mínimos (208 y 222 nm aproximadamente), que coinciden con los mínimos característicos de las hélices alfa. Esto concuerda con los datos obtenidos al realizar la deconvolución de los espectros (**Figura 10B**), que confirman que la estructura predominante es la hélice alfa, con una aportación a la estructura secundaria de aproximadamente el 80%. Estos datos son similares en todos los casos, por lo que se puede concluir la mutación realizada sobre el canal KcsA no tiene una repercusión relevante en la estructura secundaria de la proteína en ninguna de las condiciones iónicas ensayadas.

8.2.3 Caracterización de la estructura terciaria

Al igual que ocurre con el dicroísmo circular, los cambios conformacionales que afectan tanto a KcsA wt como a KcsA R64D, tienen como consecuencia una variación en la fluorescencia intrínseca de la proteína, lo que nos permite usar esta técnica como indicativo de los posibles cambios estructurales originados por la propia mutación y por variaciones en el entorno de la proteína.

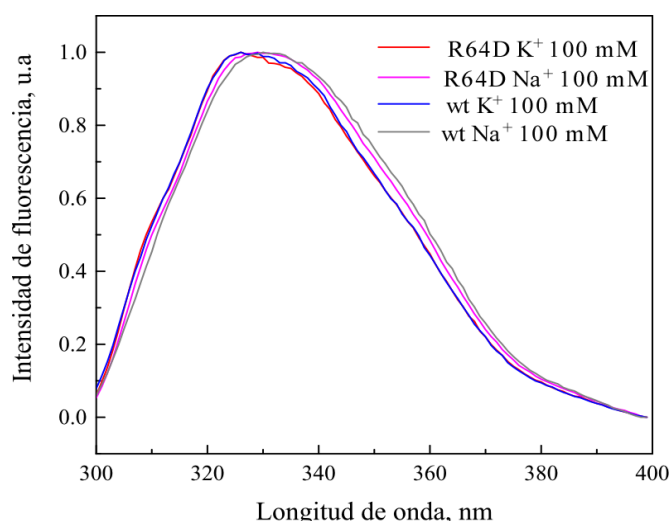


Figura 11. Caracterización de la estructura terciaria del canal de K^+ KcsA R64D en una solución con detergente (DDM 5mM, HEPES 20 mM). Se representa el espectro de emisión de la fluorescencia intrínseca de KcsA silvestre y mutante en presencia de los iones K^+ y Na^+ .

En primer lugar, se aprecia un desplazamiento del espectro hacia el rojo cuando la proteína KcsA se encuentra en Na^+ con respecto al espectro de la proteína en K^+ .

En cuanto a las diferencias observables entre KcsA wt y R64D, en presencia de K^+ , la respuesta es muy similar. Esto se puede ver también atendiendo a la tabla de los centros de masas donde se ve que la diferencia entre ambos no es importante. En cambio, sí hay diferencias entre los espectros y los centros de masas en presencia de Na^+ para KcsA wt y R64D, ya que en el primer caso, el desplazamiento que sufre hacia el rojo es más acusado.

Los centros de masas obtenidos de cada muestra se recogen en la siguiente tabla:

Canal	$\langle \lambda \rangle$ nm
WT K^+ 100 mM	336,1
WT Na^+ 100 mM	337,8
R64D K^+ 100 mM	336,2
R64D Na^+ 100 mM	337,2

8.2.4 Estabilidad térmica e interacción con iones permeantes y bloqueadores

Se ha demostrado que la desnaturalización térmica inducida a KcsA es un proceso cooperativo e irreversible y conlleva la disociación de su estructura tetramérica y el desplegamiento parcial del monómero.²¹ Cuanto más estable sea la proteína, mayor temperatura alcanzará antes de desnaturalizarse. Al unirse a la proteína, los iones tienden a aumentar la estabilidad de ésta, por lo que para caracterizar su unión, se midieron los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína a diferentes concentraciones de iones en función de la temperatura en ensayos de desnaturalización térmica. En primer lugar, en estos ensayos se estudió la unión de Na^+ y de K^+ a KcsA R64D en

condiciones no competitivas, es decir, en presencia de un solo ion. En la **figura 12** se ilustra la monitorización de la desnaturalización térmica.

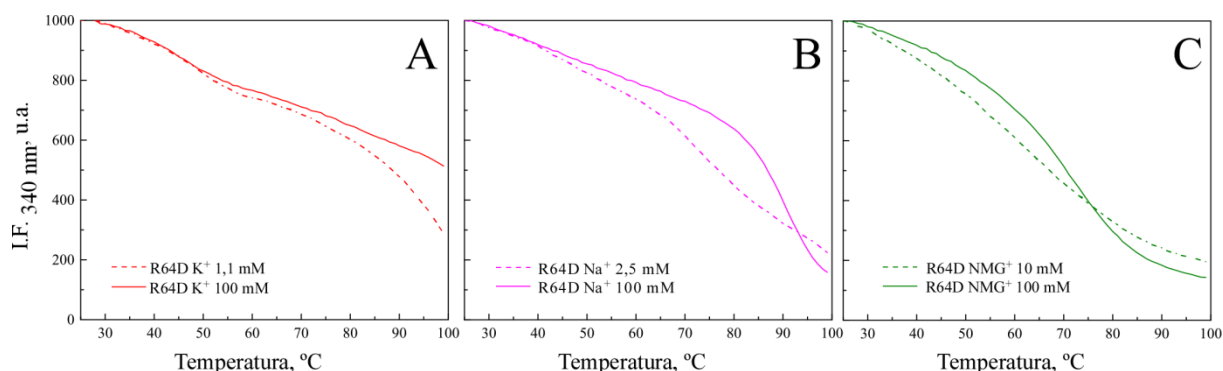


Figura 12. Monitorización de la intensidad de fluorescencia emitida por KcsA R64D en diferentes condiciones iónicas durante el proceso de desnaturalización térmica. Las muestras se encuentran a una concentración de $1\mu\text{M}$ en un tampón con DDM 50 mM, HEPES 200 mM y sal (K^+ , Na^+ o NMG^+ , según el caso) 100 mM. La temperatura se aumentó a una velocidad de $0.6\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$

El experimento de desnaturalización térmica tiene comportamiento sigmoideo. En el rango más bajo de temperaturas (línea de base que representa el estado nativo), la fluorescencia intrínseca de la proteína disminuye ligeramente y de forma lineal debido a un apagamiento de la fluorescencia como resultado del aumento de la temperatura. Luego, se produce un pronunciado descenso de la intensidad de fluorescencia caracterizado por la temperatura media de desnaturalización (T_m) y por último, se vuelve a recuperar la línea base, que en este caso representa el estado desnaturalizado.²¹

En la **figura 12** se puede observar que para KcsA R64D, un aumento en la concentración de iones se traduce en un aumento de la estabilidad térmica, tal como se ha observado en el canal wt.²⁹ A diferencia del KcsA wt, en R64D, este aumento de la estabilidad, es tan grande que en el caso del K^+ apenas podemos ver el inicio de la transición de tetrámero a monómero y en el del Na^+ no se ve la transición completa (**Figura 12A,B**). En ambos casos, la temperatura de desnaturalización supera los 100°C , por lo que queda fuera del rango de trabajo del fluorímetro.

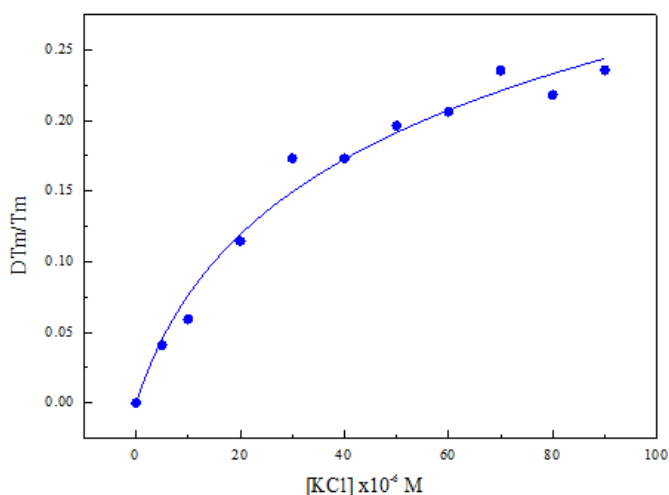


Figura 13. Análisis matemático de la unión de potasio a KcsA R64D $1\mu\text{M}$ en buffer Hepes 20 mM, DDM 5 mM, NMG 5 mM, pH 7.0. La línea continua representa el mejor ajuste utilizando la ecuación 2 (ver materiales y métodos).

Fue por este motivo por el que se dializó la proteína frente a NMG^+ . En el caso de la NMG^+ , al no interactuar con el filtro de selectividad debido a su gran tamaño, no aumenta tanto la T_m de modo que sí se puede estudiar el incremento de la estabilidad térmica en función de la concentración de iones (Figura 12C). Gracias a ello, se pudieron añadir pequeñas concentraciones crecientes de iones K^+ a la proteína dializada frente a NMG^+ . Se puede observar que los datos obtenidos se ajustan a un modelo de un único sitio de unión para el K^+ , con una constante de disociación de $9 \pm 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (Figura 13).

8.2.5 Caracterización de unión de lípidos a KcsA R64D en micelas de DDM

Además de los iones, hay otras moléculas que pueden unirse a KcsA y aumentar su estabilidad. Una de estas moléculas son los lípidos. En este proyecto se estudió el efecto estabilizante de los lípidos según su carga aniónica o zwitteriónica en un sistema de micelas mixtas que contiene una pequeña proporción de lípidos (PA en el caso del aniónico y PC en el del zwitteriónico) y un exceso de detergente (DDM). Para poder observar el efecto estabilizante de éstos, se dializó la proteína frente a NMG^+ 100 mM, ya que no aumentaba tanto la estabilidad de R64D.

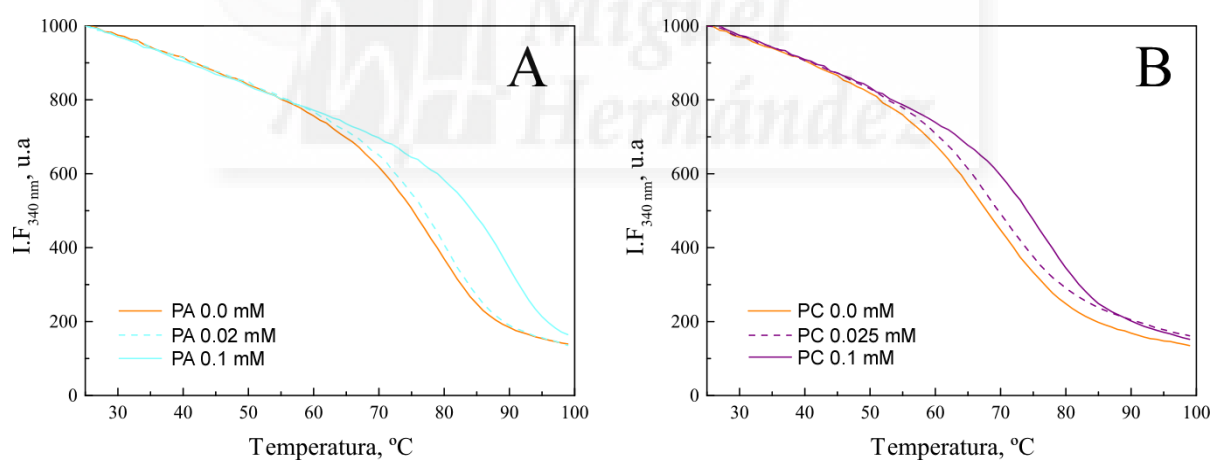


Figura 14. Monitorización de la desnaturalización térmica de R64D en diferentes condiciones: en presencia de PA (lípidos iónicos) (A) y de PC (lípidos zwitteriónicos) (B) durante el proceso de desnaturalización térmica. En ambos casos, la línea naranja representa el control. Las muestras se encuentran a una concentración de $1 \mu\text{M}$ en un tampón con DDM 5 mM, HEPES 20 mM y NMG^+ 5 mM.

En la Figura 14A se observa cómo la adición de pequeñas cantidades de lípido aumenta la estabilidad térmica del canal como es el caso del PA, que al unirse a la proteína, desplaza la curva de desnaturalización hacia la derecha, a temperaturas mayores. En cambio, en presencia de PC apenas se observa dicho desplazamiento (Figura 14B). El aumento de la estabilidad que observamos alcanza los 25 °C en el caso del PA, mientras que en el caso del PC, este aumento es de tan sólo

5°C. Además, con el primero no podemos ver la saturación ya que aumenta tanto la temperatura de desnaturalización que se sale del rango medible por nuestro aparato (**Figura 15**).

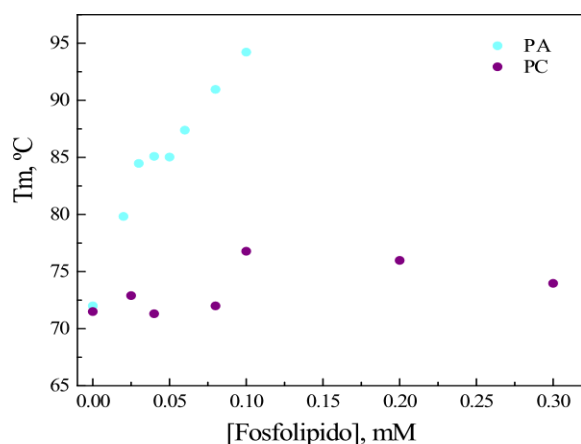


Figura 15. Dependencia de la T_m de la concentración de lípido tanto aniónico como zwiteriónico de 1 μ M de R64D en un tampón con 5 mM DDM, 20 mM HEPES y 5 mM de NMG^+ .

8.3 Caracterización funcional de KcsA R64D reconstituidas en liposomas de asolectina: efecto de la adición de lípidos con carga negativa

Para tratar de averiguar cómo afecta la mutación R64D a la función de KcsA, se registró su actividad en condiciones simétricas de K^+ 100 mM. Además también se investigó el efecto que tenían los lípidos aniónicos en ésta para poder compararlo con el observado previamente a este trabajo en el laboratorio en canal silvestre.

El canal wt se caracteriza por presentar ráfagas de actividad separados por largos periodos silentes. Durante su actividad, fluctúa rápidamente entre los estados abierto y cerrado (**Figura 16D**).²⁶ Al comparar el comportamiento de wt con R64D se vio que esta pauta desaparecía. En su lugar, el canal se mantiene la mayor parte del tiempo en el estado abierto. Esto es debido a que, como se puede observar, se produce un aumento en la probabilidad de apertura, al igual que en la intensidad de corriente en R64D (**Figura 16B**). Otra diferencia entre wt y R64D, es que en el primero la intensidad de corriente a potenciales positivos es superior a la de los potenciales negativos, por lo que en la I-V no es simétrica, es decir, hay rectificación de salida. Por el contrario, en R64D no se producen dichas diferencias y presenta una I-V simétrica (**Figura 16A**)

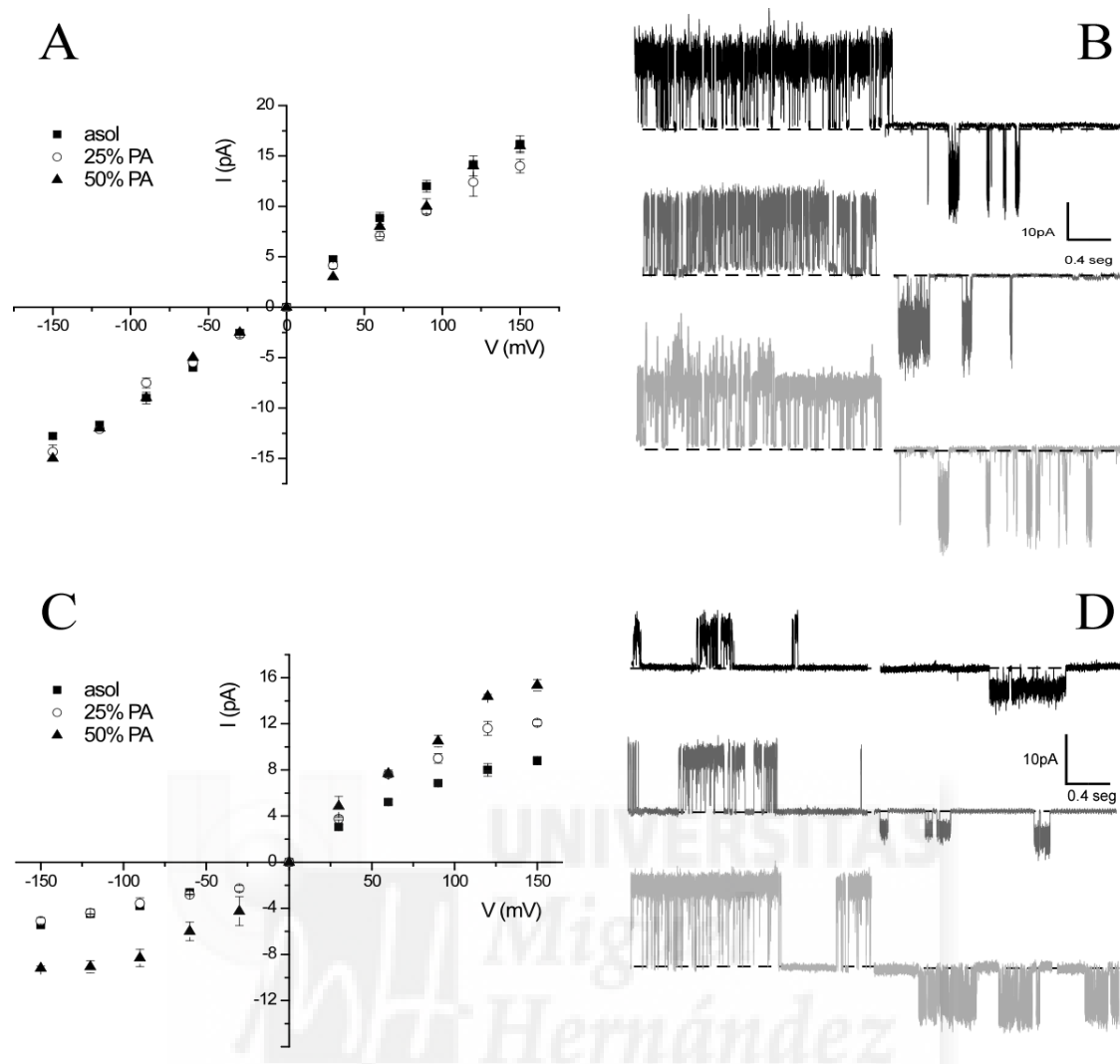


Figura 16. Representación de la gráfica I-V (intensidad vs voltaje) para R64D (A) y wt (C) en condiciones simétricas (K^+ 100 mM) con variación el contenido de lípido aniónico para observar su efecto (0%, 25% y 50% PA). Registros de R64D (B) y wt (D) a 150 mV y -150 mV mediante parche escindido inside-out en condiciones simétricas (K^+ 100 mM). en tres condiciones experimentales diferentes: sin lípido (negro), con 25% PA (gris oscuro) y con 50% de PA (gris claro). Los resultados de wt fueron obtenidos en el laboratorio previamente.

Por otro lado, los lípidos aniónicos alteran el comportamiento de KcsA. Para estudiar las diferencias que causan los lípidos en presencia y en ausencia de mutación, se reconstituyó KcsA R64D en liposomas multilaminares gigantes con un contenido en PA de 0%, 25% y 50%.

En wt, se observa una dependencia de la probabilidad de apertura (P_O) y la concentración de lípido: conforme aumenta la concentración de lípido aniónico, aumenta la P_O . Del mismo modo, la intensidad de corriente también se vuelve mayor en dichas condiciones (**Figura 16C y D**).

Sin embargo, R64D no parece presentar una relación entre la unión de lípidos y su probabilidad de apertura ni la intensidad de corriente, ya que se observa que en todos los casos es similar (**Figura 16B**).

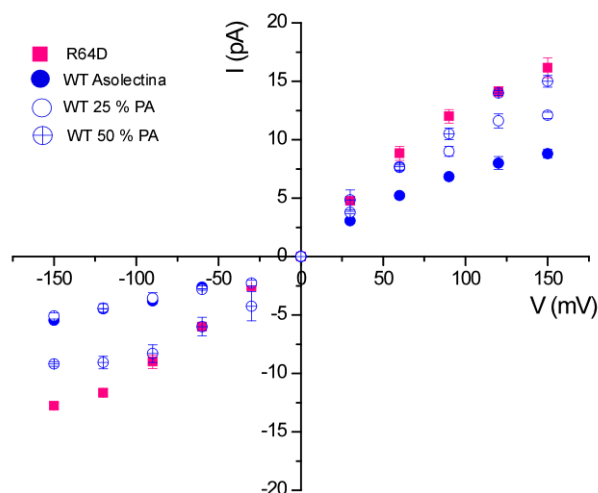


Figura 17. Representación de la gráfica I-V en condiciones simétricas (100 mM K^+) de R64D, wt en asolectina, wt en 25% PA y wt en 50% PA.

Cabe destacar que los resultados observados para el wt con una concentración de PA del 50% son similares en cuanto a intensidad de corriente y probabilidad de apertura para R64D en las distintas condiciones de lípidos. Esto podría indicar un efecto análogo entre la mutación R64D y la presencia de lípidos aniónicos sobre KcsA silvestre (**Figura 17**).

9. DISCUSIÓN

La mutación R64D tiene múltiples efectos sobre el canal KcsA. En primer lugar, el rendimiento de la purificación (1,6 mg/L) aumentó si lo comparamos con wt (1 mg/L).

Tanto en una solución con detergente como en una membrana lipídica, el canal KcsA silvestre sufre cambios conformacionales y de estabilidad cuando se encuentra en diferentes condiciones iónicas.²⁹ Esta propiedad fue utilizada para determinar el efecto en la estructura que puede causar la mutación R64D.

La mutación que tratamos en este proyecto mantiene el estado tetramérico en distintas condiciones iónicas (Na^+ , K^+) e incluso con iones no permeantes como el caso de la NMG^+ (**Figura 8**). No origina grandes cambios en la estructura secundaria de la KcsA tal y como se observa en los espectros de CD en el ultravioleta lejano (**Figura 10**), sin embargo, sí es capaz de inducir cambios en la estabilidad y en la función de la proteína, como se tratará posteriormente. En cuanto a la estructura terciaria determinada por medición del espectro de fluorescencia (**Figura 11**), tampoco se observan cambios

característicos debidos a esta mutación. Únicamente se ve menor desplazamiento hacia el rojo en el caso de R64D con respecto a wt cuando están en presencia de Na^+ .

En el caso de la estabilidad térmica, para KcsA wt, tal y como se ha observado en wt, tanto el Na^+ como el K^+ se unen al canal y aumentan su estabilidad.²⁹ Esto se fundamenta en la “hipótesis de la afinidad iónica”, según la cual, las interacciones de los iones entre las subunidades del canal en el filtro de selectividad aumentarían su estabilidad. En el caso del K^+ , este aumento de la estabilidad sucede en dos fases, sugiriendo que hay dos sitios termodinámicamente diferentes a los que se pueden unir estos iones^{29,21}. El sitio donde se une el K^+ a bajas concentraciones se denominará de alta afinidad mientras que el sitio donde se une cuando está a altas concentraciones será de baja afinidad.

De igual modo, en R64D se observa que tanto el K^+ como el Na^+ también aumentan la estabilidad de la proteína (**Figura 12**), siempre con temperaturas superiores a wt, lo que estaría justificado por la formación de un puente salino entre cada par de subunidades del canal a través de los residuos del sitio no anular D64 y R89.³² Por otro lado, en el ensayo de desnaturalización térmica con K^+ de R64D observamos que los datos se ajustan a un modelo de una proteína con un único sitio de unión. Puesto que R64D tiene una gran probabilidad de apertura (**Figura 16B**), se presupone que, al igual que en wt, hay también un segundo sitio de unión para el K^+ (sitio de baja afinidad) que sería la responsable del paso al estado conductor del canal. El hecho de no poder hallar el segundo sitio de unión sería debido a la gran estabilidad de R64D, ya que al aumentar tanto la concentración de iones, la temperatura de desnaturalización se saldría del rango observable.

Por este mismo motivo, para poder calcular la constante de disociación del primer evento de unión fue necesario bajar mucho la concentración de iones K^+ , lo cual se logró gracias a su diálisis frente a NMG^+ , que es un ión demasiado grande como para acceder al filtro de selectividad. Aun así estabiliza ligeramente el canal debido al aumento de la fuerza iónica del medio donde se encuentra. La constante de disociación calculada, fue $(9\pm3)\cdot 10^{-6}$ M (**Figura 13**), que si la comparamos con la primera del fenotipo silvestre, la que da lugar a la conformación no conductora, es $(2\pm0,5)\cdot 10^{-6}$ M, por lo que vemos que la mutación R64D no provoca una variación notable en la afinidad por este ion.

Además de su interacción con iones, en la estabilización de la proteína también pueden participar otras moléculas como son los lípidos. Los lípidos aniónicos pueden unirse con gran afinidad al sitio no anular de la proteína, próximo a las argininas 64 y 89 debido a la densidad de carga positiva en esta zona de la proteína.³⁸

Resultados previos del laboratorio determinaron una alta estabilidad térmica para R64D en presencia de K^+ 100 mM, por lo que no se pudo determinar la temperatura de desnaturalización en presencia de lípidos aniónicos y zwitteriónicos. En este proyecto, en cambio, sí se logró debido al hallazgo de la

estabilidad tetramérica de R64D en NMG^+ , una sal que, como ya se ha comentado, no aumenta tanto la estabilidad del canal al no interactuar con el poro.

En wt, se ha propuesto que el lípido aniónico se une al sitio no anular provocando un aumento en su estabilización, de modo que su temperatura de desnaturalización aumenta en 20°C. En cambio, cuando se le añade lípido zwitteriónico la temperatura aumenta únicamente 7°C.³¹ Esto coincide con lo observado por Weingarth *et al*³² y es debido a que se forma una especie de sándwich entre la Arg 64, la Arg 89 del sitio no anular y el lípido, neutralizando así la carga positiva de éstas. La consecuencia de ello es que los lípidos mantienen unidas las subunidades que forman el tetrámero, evitando su disociación. En el caso de R64D, se ha propuesto que el cambio de un aminoácido positivo por uno negativo puede tener consecuencias en este comportamiento, puesto que se formaría un puente salino con R89, dando lugar a un efecto similar a la unión del lípido en el sitio no anular, pero sin que éste esté presente. De esta manera esperaríamos una alta estabilidad de la proteína, pero no ver un aumento en la misma al añadir lípido negativo, o un aumento equivalente al lípido zwitteriónico. Sin embargo, en nuestros resultados sí que se observa un aumento de 25°C en el caso del lípido aniónico (PA) y de 5°C en el caso del lípido zwitteriónico (PC) (**Figura 15**). Esto nos lleva a pensar que el lípido se pueda estar uniendo a otra zona de la proteína, en los llamados *hot spots* (sección 5.3.5), que gracias a las interacciones de enlace de hidrógeno y fuerzas electrostáticas que establecen estabilizan KcsA frente a la temperatura. De esta manera el ensayo de desnaturalización térmica no nos permite identificar de manera inequívoca si los lípidos aniónicos pueden o no unirse a los sitios no anulares en la mutante R64D.³⁹

A nivel funcional, en este trabajo se ha podido observar que el cambio de un aminoácido cargado positivamente como es la arginina 64 por otro negativo como es el aspártico favorece la probabilidad de apertura y aumenta la intensidad de corriente. Esto difiere de lo observado por Marius *et al*.³⁶ cuyo experimento consistió en la mutación de la arginina 64 por una leucina (R64L). En este caso, el cambio de aminoácido cargado positivamente a aminoácido no cargado provoca el efecto contrario al que hemos observado, ya que disminuye la probabilidad de apertura. Sin embargo, no siempre es así ya que se ha comprobado que al mutar la arginina 64 por una alanina (R64A) se observa un efecto muy similar a R64D pero a diferencia de este, dicho mutante sí que se ve afectado por el cambio en la concentración de lípido aniónico. Por tanto, el efecto que causa la mutación en la arginina 64 puede tener efectos muy diversos en función del aminoácido por el que se reemplace.

Por otro lado, cabe destacar el papel de los lípidos aniónicos en la actividad de KcsA y su efecto cuando éste presenta la mutación R64D.

Cuando se añade lípido negativo a wt, se puede observar un aumento tanto en la probabilidad de apertura, como en la intensidad de corriente que pasa a su través, que depende fuertemente de la

concentración de éste. Como propusieron Marius *et al.*³⁸ este aumento en la probabilidad de apertura necesita de la unión de los lípidos a más de un sitio no anular. En el caso R64D, no se aprecia ninguna diferencia notable ni en la probabilidad de apertura ni en la intensidad de corriente a distintas concentraciones de lípido (PA) (**Figura 16**). De hecho, la actividad de wt en presencia de 50% de PA es muy similar a la de R64D (**Figura 16**).

El aumento en la probabilidad de apertura que la mutación R64D o la presencia de lípidos en KcsA silvestre provocan, se debe a que de cualquiera de estas dos formas se consigue aumentar la probabilidad de transición del estado inactivado al estado abierto y/o la disminución de la probabilidad de la transición del estado abierto a inactivo. Una hipótesis de cómo lo consiguen podría ser la siguiente: en presencia de lípido aniónico, R64 tendería a interaccionar con este, dejando de interaccionar con D80 (participa en la tríada de inactivación E70-D80-W67), lo que le permitiría una mayor libertad de movimiento y por tanto debilitando la tríada de la que éste forma parte (**Figura 7**). Por tanto, el efecto observado será el de una mayor probabilidad de apertura en presencia de lípidos. Del mismo modo, cuando se produce la mutación de la arginina 64 por aspártico, lo que se observa es un aumento en la actividad similar al que se produce en presencia de lípidos. Esto se puede deber a que al cambiar la carga positiva del residuo 64 por una negativa, éste, forme parte de un puente salino con R89. Como consecuencia, se deja del mismo modo que en presencia de lípidos, mayor libertad conformacional a D80 y se desestabiliza la tríada teniendo como resultado en última instancia una mayor actividad del canal.

10. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

La mutación R64D, objeto de estudio en este proyecto, tiene como consecuencia alteraciones en la estabilidad y en la función del canal KcsA. Por un lado, dota a la proteína de una mayor estabilidad térmica y por otro, aumenta tanto la intensidad de corriente como la probabilidad de apertura.

Estos efectos se explican por la formación de un puente salino que se forma entre el residuo D64 de una subunidad y R89 de la subunidad contigua y a la no interacción entre D64 y D80 (en wt R64 interacciona con D80), que genera una mayor libertad conformacional para este último, debilitando la tríada de inactivación E70-D80-W67.

Debido al cambio de un aminoácido positivo (R) por uno negativo (D) en la posición 64, que está próxima al sitio no anular donde se unen los lípidos, se esperaría que estos no se unieran a R64D. Sin embargo, se observó el aumento de la estabilización térmica en 25°C con la adición de PA (lípido aniónico). Esto da pie a pensar que los lípidos aniónicos podrían estar uniéndose en otra zona de la proteína, los denominados *hot spots*.

En el caso de los ensayos funcionales, se ha visto que la R64D presenta una intensidad de corriente similar tanto en presencia como en ausencia de lípidos y que además, es similar a aquella observada en wt en presencia de lípidos aniónicos (50% PA). Esto es consistente con la explicación de que el lípido aniónico no se une al sitio no anular en R64D –por eso no se encuentran diferencias en presencia y ausencia de éste– y que el puente salino entre D64 y R89 mantiene unidas las subunidades, provocando un efecto análogo al de los lípidos aniónicos en wt. Por otra parte, en cuanto a la probabilidad de apertura vemos que en R64D es mayor gracias a la desestabilización de la tríada de inactivación como se ha explicado previamente.

Con los resultados obtenidos, no podemos obtener una conclusión firme acerca de si los lípidos aniónicos se unen o no al sitio no anular puesto que en los ensayos de actividad vemos que el efecto de éstos es nulo mientras que en los ensayos de estabilidad térmica sí se observa un incremento de estabilidad a consecuencia del aumento de la concentración de lípidos. Como solución se podría hacer un ensayo de fluorescencia que confirme nuestra hipótesis de que el efecto de estabilización originado por lípidos aniónicos es debido a su unión *hot spots* y no al sitio no anular. Para hacer este ensayo, en primer lugar habría que mutar los triptófanos 113, 87 y 26 de R64D a leucina y comprobar si es funcional, ya que en wt sí que lo es³⁸. La finalidad de ello es poder medir así únicamente la fluorescencia proveniente de W67 y W68. Posteriormente, habría que añadir lípido negativo brominado que, al unirse al sitio no anular, *quenchearía* la fluorescencia de dichos triptófanos. Esta disminución de la fluorescencia depende de la distancia entre el bromo y el triptófano elevada a la sexta potencia.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger. Principios de bioquímica*. (2009).
2. Feduchi, E. *Bioquímica. Conceptos esenciales*. (Editorial Panamericana, 2010).
3. Alberts, B. *et al. Biología molecular de la célula*. (Ediciones Omega, 2004).
4. Jiang, Y. *et al.* The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**, 523–546 (2002).
5. Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*. (Panamericana, 2007).
6. Latorre, R., López-Barneo, J., Bezanilla, F. & Llinás, R. *Biofísica y fisiología celular*. (Universidad de Sevilla, 1996).

7. Doyle, D. A. *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77 (1998).
8. Hille, B. *IONIC CHANNELS OF EXCITABLE MEMBRANES*. (2001).
9. Snyders, D. J. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc.Res.* **42**, 377–390 (1999).
10. Miller, C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* **1**, REVIEWS0004 (2000).
11. MacKinnon, R. Potassium channels. in *FEBS Letters* **555**, 62–65 (2003).
12. Kuang, Q., Purhonen, P. & Hebert, H. Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 3677–93 (2015).
13. Congreso, I. X., La, A. D. E. & Canalopatías, A. Canalopatías Con Manifestaciones Neurológicas. *Rev Neurol* **34**, 150–156 (2002).
14. Schrempf, H. *et al.* A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **14**, 5170–5178 (1995).
15. Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R. & Schrempf, H. Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* **462**, 447–452 (1999).
16. LeMasurier, M., Heginbotham, L. & Miller, C. KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **118**, 303–14 (2001).
17. H. Schrempf, O. Schmidt, R. Kummerlen, S. Hinnah, D. Muller, M. Betzler, T. Steinkamp, R. W. A prokaryotic potassium ion channel with tow predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* **14**, 5170–5178 (1995).
18. Cortes, D. M. Molecular architecture of full-length KcsA: Role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating. *J. Gen. Physiol.* **117**, 165–180 (2001).
19. Uysal, S. *et al.* Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 6644–9 (2009).
20. Molina, M. L. *et al.* Influence of C-terminal protein domains and protein-lipid interactions on tetramerization and stability of the potassium channel KcsA. *Biochemistry* **43**, 14924–14931 (2004).
21. Renart, M. L. *et al.* Ion binding to KcsA: Implications in ion selectivity and channel gating.

- Biochemistry* **49**, 9480–9487 (2010).
22. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F. & Perozo, E. A Quantitative Description of KcsA Gating I: Macroscopic Currents. *J. Gen. Physiol.* **130**, 465–478 (2007).
 23. Chakrapani, S., Cordero-Morales, J. F. & Perozo, E. A quantitative description of KcsA gating II: single-channel currents. *J. Gen. Physiol.* **130**, 479–496 (2007).
 24. Gao, L., Mi, X., Paajanen, V., Wang, K. & Fan, Z. Activation-coupled inactivation in the bacterial potassium channel KcsA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17630–5 (2005).
 25. Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G. & Perozo, E. Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 319–22 (2006).
 26. Cordero-Morales, J. F. *et al.* Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 311–8 (2006).
 27. Blunck, R., Cordero-Morales, J. F., Cuello, L. G., Perozo, E. & Bezanilla, F. Detection of the opening of the bundle crossing in KcsA with fluorescence lifetime spectroscopy reveals the existence of two gates for ion conduction. *J Gen Physiol* **128**, 569–581 (2006).
 28. Thompson, A. N., Posson, D. J., Parsa, P. V & Nimigean, C. M. Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 6900–5 (2008).
 29. Renart, M. L. *et al.* Contribution of ion binding affinity to ion selectivity and permeation in KcsA, a model potassium channel. *Biochemistry* **51**, 3891–3900 (2012).
 30. VanDongen, A. M. J. K channel gating by an affinity-switching selectivity filter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3248–52 (2004).
 31. Triano, I. *et al.* Occupancy of nonannular lipid binding sites on KcsA greatly increases the stability of the tetrameric protein. *Biochemistry* **49**, 5397–5404 (2010).
 32. Weingarth, M. *et al.* Structural determinants of specific lipid binding to potassium channels. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3983–3988 (2013).
 33. Brohawn, S. G., Campbell, E. B. & MacKinnon, R. Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2129–34 (2013).
 34. Valiyaveetil, F. I., Zhou, Y. & MacKinnon, R. Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry* **41**, 10771–10777 (2002).

35. Williamson, I. M., Alvis, S. J., East, J. M. & Lee, A. G. Interactions of phospholipids with the potassium channel KcsA. *Biophys. J.* **83**, 2026–38 (2002).
36. Marius, P., De Planque, M. R. R. & Williamson, P. T. F. Probing the interaction of lipids with the non-annular binding sites of the potassium channel KcsA by magic-angle spinning NMR. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 90–96 (2012).
37. Poveda, J. A. *et al.* Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1838**, 1560–1567 (2014).
38. Marius, P. *et al.* Binding of anionic lipids to at least three nonannular sites on the potassium channel KcsA is required for channel opening. *Biophys. J.* **94**, 1689–1698 (2008).
39. Raja, M. The potassium channel KcsA: A model protein in studying membrane protein oligomerization and stability of oligomeric assembly? *Arch. Biochem. Biophys.* **510**, 1–10 (2011).
40. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
41. Kelly, S. M. M. M. & Price, N. C. C. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 349–84 (2000).
42. Zagotta, W. N. Membrane biology: permutations of permeability. *Nature* **440**, 427–429 (2006).
43. Morais-Cabral, J. H. H. J. H. *et al.* Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* **414**, 37–42 (2001).